

## Preparation of culture solutions containing high molecular weight hyaluronic acids

Patent number: DE19548954  
Publication date: 1997-07-03  
Inventor: MUELLER PETER-JUERGEN DR RER N (DE);  
OZEGOWSKI JOERG HERMANN DR RER (DE);  
GUENTHER ELISABETH DR MED (DE); VEITH  
GERHARD DR RER NAT (DE); LIEBISCH WOLFGANG  
DIPL ING (DE)  
Applicant: KNOELL HANS FORSCHUNG EV (DE)  
Classification:  
- international: C08B37/08; C12P19/26; C08B37/00; C12P19/00;  
(IPC1-7) A61K47/36; C12P19/04; C08B37/08;  
C12P19/04; C12R1/46; A61K7/00; A61K31/725  
- european: C08B37/00P2F; C12P19/26  
Application number: DE19951048954 19951228  
Priority number(s): DE19951048954 19951228

[Report a data error here](#)

### Abstract of DE19548954

Preparation of culture solutions containing hyaluronic acids (or salts of these), using microorganisms of the genus Streptococcus, comprises the fermentation of Streptococcus equi ssp. zooepidemicus V 2541 (DSM 10348; a hyaluronic acid former), in a fed-batch, semi-continuous or continuous culture, at a constant pH of 6.4-7.6 and a constant temperature of 30-40 deg C, with maintenance of the glucose supply. The hyaluronate dissolved in the culture solution has a molecular weight  $> 2.5 \cdot 10^6$  Da.

Data supplied from the [esp@cenet](mailto:esp@cenet) database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑳ Aktenzeichen: 195 48 954.3  
㉑ Anmeldetag: 28. 12. 95  
㉒ Offenlegungstag: 3. 7. 97

㉑ Anmelder:

Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung e.V.,  
07745 Jena, DE

㉒ Erfinder:

Müller, Peter-Jürgen, Dr.rer.nat., 07745 Jena, DE;  
Ozegowski, Jörg-Hermann, Dr.rer.nat., 07747 Jena,  
DE; Günther, Elisabeth, Dr.med., 07745 Jena, DE;  
Veith, Gerhard, Dr.rer.nat., 07745 Jena, DE; Liebisch,  
Wolfgang, Dipl.-Ing., 07646 Waldeck, DE

㉓ Biotechnologische Herstellung von Hyaluronat enthaltenden Kulturlösungen

㉔ Die Erfindung betrifft ein Herstellungsverfahren für Kultur-  
lösungen, die Hyaluronat mit besonders hoher Molmasse  
enthalten, durch Kultivierung einer Leistungsselektante der  
Art *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* V 2541. Die  
Kultivierung wird als batch-, fedbatch- oder als kontinuierli-  
che Fermentation nach einem angepaßten Regime von  
pH-Wert-Verlauf und Glukosedosage durchgeführt. Es wer-  
den hohe Raum-Zeit-Ausbeuten erreicht.

Hyaluronsäure und ihre Salze, die Hyaluronate, sind natürlich vorkommende Biopolymere, die aus linearen Ketten sich wiederholender Einheiten von Glucuronsäure und N-Acetylglucosamin aufgebaut sind. Aufgrund der wasserhaltenden Eigenschaften sind sie für die gelförmige Struktur des Bindegewebes verantwortlich. Die hyaluronathaltigen Bindegewebsstrukturen schützen die Gewebe vor dem Eindringen von Substanzen und Bakterien und wirken formstabilisierend. Andererseits führt die vermehrte Einlagerung von Hyaluronat zu einer Auflockerung des Gewebes, wodurch physiologische Prozesse vorbereitet werden. Hyaluronat ist an wichtigen biologischen Prozessen, wie Zellbeweglichkeit, Zelldifferenzierung und Metastasenbildung beteiligt. Seine Biokompatibilität, die hohe Viskoelastizität der Lösung, die enzymatische Abbaubarkeit und die Nichtimmunogenität machen das Hyaluronat zu einem medizinisch wichtigen Biomaterial, das beispielsweise in der Augenheilkunde und bei Gelenkerkrankungen sowie zur Freisetzung von Medikamenten eingesetzt wird. In kosmetischen Produkten wird Hyaluronat als körperverschträglicher wasserhaltender Zusatz verwendet. Je größer das Hyaluronatmolekül, bzw. seine Molmasse ist, desto geeigneter ist das Hyaluronat für die genannten Anwendungen.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein biotechnologisches Verfahren zur fermentativen Gewinnung von hochmolekularer Hyaluronsäure bzw. ihrer Salze, insbesondere des Natriumsalzes (im folgenden Text einheitlich als Hyaluronate bezeichnet). Das erfindungsgemäß hergestellte Hyaluronat ist als wasserbindende Substanz beispielsweise in der kosmetischen Industrie oder als Ausgangsprodukt für ein in der Medizin anwendbares Hyaluronat oder als Reaktant bei der Herstellung pharmakologisch aktiver Substanzen einsetzbar.

Hyaluronat wurde bis Mitte der achtziger Jahre durch Extraktion aus tierischen Geweben gewonnen. Dann wurden biotechnologische Herstellungsverfahren eingeführt, mit denen Nachteile der bisherigen Gewinnung umgangen werden können.

Bei der biotechnologischen Herstellung werden Hyaluronat bildende Mikroorganismen der Gattung *Streptococcus*, insbesondere der Lancefieldgruppe C verwendet. So werden überwiegend die Arten *Streptococcus equi* (WO 9208799 v. 29. Mai 1992, US 5071751 v. 10. Dezember 1991, JP 01225491 v. 8. September 1989, JP 63141594 v. 14. Juni 1988, JP 63123392 v. 27. Mai 1988, EP 266578 v. 11. Mai 1988, JP 63028398 v. 6. Februar 1988, JP 62289198 v. 16. Dezember 1987, JP 62215397 v. 22. September 1987, EP 144019 v. 12. Juni 1986, EP 143393 v. 5. Juni 1986, JP 61063294 v. 1. April 1986, DE 35 31 612 v. 27. März 1986, JP 61015698 v. 23. Januar 1986) und *Streptococcus equi*, subspecies *Streptococcus zooepidemicus* (JP 06070782 v. 15. März 1994, CS 276099 v. 15. April 1992, JP 02245193 v. 28. September 1990, JP 02058502 v. 27. Februar 1990, US 4897349 v. 30. Januar 1990, JP 01067196 v. 13. März 1989, JP 63094988 v. 26. April 1988, JP 63012293 v. 19. Januar 1988, JP 62289197 v. 16. Dezember 1987, EP 244757 v. 11. November 1987, JP 62257901 v. 10. November 1987, JP 62051999 v. 6. März 1987, JP 62032893 v. 12. Februar 1987, JP 61219394 v. 29. September 1986, WO 8604355 v. 31. Juli 1986, DE 35 17 629 v. 28. November 1985, JP 58056692 v. 4. April 1983) eingesetzt. Daneben werden *Streptococcus pyogenes* (Lancefieldgruppe A) (FR 2617849 v. 13. Januar 1989, WO 8403302 v. 30. August 1984), *Pasteurella*-Arten (JP 02245193 v. 28. September 1990) und einige nicht näher bestimmte *Streptococcus*-Stämme (JP 06098787 v. 12. April 1994, JP 06038783 v. 15. Februar 1994, JP 05276972 v. 26. Oktober 1993) angegeben.

Die für die Produktion verwendeten Stämme werden in der Regel aufgrund ihrer Fähigkeit, unter Emers-Kultivierungsbedingungen schleimige (mukoid) Kolonien zu bilden, vorausgewählt und in der Mehrzahl der Fälle anschließend einer Mutagenese unterworfen, um noch leistungsfähigere Produzentenstämme zu finden bzw. die Bildung von Toxinen und Pyrogenen und die Eigenschaft der  $\beta$ -Hämolyse einzuschränken bzw. zu unterbinden. Eine entscheidende Voraussetzung für einen leistungsfähigen Hyaluronatbildner ist das Nichtvorhandensein von extrazellulärer Hyaluronidaseaktivität.

Die in der Patentliteratur aufgeführten mikrobiellen Herstellungsverfahren von Hyaluronsäure bzw. Hyaluronat (HS) können anhand folgender Leistungsparameter beschrieben werden:

- Endkonzentration an Hyaluronat ( $\text{gl}^{-1}$ ),
  - Prozeßdauer (h),
  - physiologische Produktivität ( $\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$ ),
  - Molmasse (D) des Hyaluronats und
  - Konversionsgrad von Glukose  $Y_{\text{HS/GI}}$  (%)
- $$Y_{\text{HS/GI}} = (\text{gebildetes Hyaluronat I verbrauchte Glukose}) \times 100\%$$

In der Patentliteratur wird beispielsweise bei batch-Fermentationen eine maximale Endkonzentration an Hyaluronat von  $6,7 \text{ gl}^{-1}$  angegeben (EP 244757 v. 11. November 1987); das entspricht bei der Prozeßdauer von 24 h einer durchschnittlichen Produktivität von  $0,28 \text{ gl}^{-1}\text{h}^{-1}$ . Nach dem gleichen Schutzrecht wird bei kontinuierlicher Fermentation mit einer Verdünnungsrate von  $0,3 \text{ h}^{-1}$  eine Hyaluronatkonzentration von  $3 \text{ gl}^{-1}$  und eine Produktivität von  $0,9 \text{ gl}^{-1}\text{h}^{-1}$  erreicht. Die Molmasse des Hyaluronats beträgt dabei  $2,16 \times 10^6 \text{ D}$ . Eine maximale Produktivität für kontinuierliche Kultivierung wird mit  $0,96 \text{ gl}^{-1}\text{h}^{-1}$  angegeben (JP 01067196 v. 13. März 1989).

Der Konversionsgrad liegt bei etwa 4% bis 8% mit Ausnahme folgender Schutzrechte: In EP 244757 v. 11. November 1987 wird ein Konversionsgrad von etwa 15%, in JP 01067196 v. 13. März 1989 von 16% angegeben.

Die Molmasse der in der Literatur beschriebenen extrazellulären Hyaluronate liegt zwischen  $0,5 \times 10^6 \text{ D}$  und  $2,5 \times 10^6 \text{ D}$ . In WO 8604355 v. 31. Juli 1986 wird ein Molmassebereich von  $2,2 \times 10^6 \text{ D}$  bis  $3,5 \times 10^6 \text{ D}$  angegeben.

Die Molmasse und auch die maximale Endkonzentration der batch Fermentationen ist in einigen Fällen nicht nur von der Art des eingesetzten Stammes abhängig, sondern wird auch durch bestimmte Zusätze zum Grundmedium positiv beeinflusst. So führt nach der Zusatz von Laurylsulfat zu einer Erhöhung der Molmasse von  $1,0 \times$

10<sup>6</sup> D auf 2,5 × 10<sup>6</sup> D und der teilweise Ersatz von Hefeextrakt durch Ammoniumnitrat nach JP 02058502 v. 27. Februar 1990 zu einer Erhöhung der Molmasse von 1,87 × 10<sup>6</sup> D auf 2,5 × 10<sup>6</sup> D. Der Zusatz von phenolischen bzw. hydroxyaromatischen Substanzen, beispielsweise von Tannin, bewirkt nach EP 266578 v. 11. Mai 1988 bzw. JP 01225491 v. 8. September 1989 eine Erhöhung der Endkonzentration von 2,4 gl<sup>-1</sup> auf 6,3 gl<sup>-1</sup> und eine Erhöhung der Molmasse von 0,43 × 10<sup>6</sup> D auf 2,5 × 10<sup>6</sup> D. Die Zugabe von Glucosamin und Pyruvat wird nach JP 62257901 v. 10. November 1987, der Zusatz von bakteriolytischem Enzym und von Blutserum nach DE 35 31 612 v. 27. März 1986 für das Erreichen einer Endkonzentration von 5,8 gl<sup>-1</sup> verantwortlich gemacht.

Es ist bekannt, daß bei semikontinuierlicher bzw. kontinuierlicher Fermentationsführung die Produktivität der Verfahren gegenüber einer Folge von batch-Fermentationen durch das Wegfallen der für die Produktbildung uneffektiven Anwachs- und Sättigungsphase der Einzelfermentationen sowie der Rüstzeiten zwischen den Einzelfermentationen wesentlich erhöht wird. Ein Maß für die Wirtschaftlichkeit ist die Raum-Zeit-Ausbeute (gl<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>), die über die Zeit des Gesamtprozesses einschließlich der Rüstzeiten berechnet wird; die physiologische Raum-Zeit-Ausbeute dagegen wird unter Bezug auf die reine Fermentationszeit berechnet.

Es ist das Ziel der Erfindung, Hyaluronsäure mit besonders hoher Molmasse — bevorzugt in Form ihrer Salze — enthaltende Kulturflüssigkeiten biotechnologisch durch Submersfermentation mit hoher und beliebig oft reproduzierbarer Leistung in Bezug auf die Raum-Zeit-Ausbeute bzw. die Produktivität effektiv in einem technischen Maßstab herzustellen.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, hyaluronathaltige Fermentationslösungen mit besonders hoher Molmasse des Hyaluronats mittels diskontinuierlicher, semikontinuierlicher oder kontinuierlicher Fermentation bei reproduzierbarer hoher und langanhaltender Produktbildung herzustellen. Diese Aufgabe wurde dadurch gelöst, daß ein spezieller mikrobieller Bildner gesucht und ein für diesen Bildner angepaßtes Fermentationsverfahren entwickelt wurde.

Unter 299 vorausgewählten Stämmen wurde ein Stamm erhalten, mit dem unter den Bedingungen einer Fermentation in einem gerührten und schwach belüfteten Fermenter bei Konstanthaltung der Azidität zwischen pH 6,4 und pH 7,6 und der Temperatur zwischen 30°C und 40°C eine hohe Raum-Zeit-Ausbeute erreicht wird. Es wurde festgestellt, daß dieser Stamm keine Hyaluronat abbauende enzymatische Aktivität aufweist. Er erzeugt bei einer adäquaten Fermentationsführung (fed batch) in der Kulturlösung eine Hyaluronatkonzentration (bestimmt als Hyaluronsäure) zwischen 7 gl<sup>-1</sup> und 9 gl<sup>-1</sup>. Die Molmasse des Hyaluronats liegt über 2,5 × 10<sup>6</sup> D, insbesondere im Bereich von 2,5 × 10<sup>6</sup> D bis 9,0 × 10<sup>6</sup> D (bestimmt mit HPLC). Der Konversionsgrad Y<sub>HS/Gl</sub> der Umwandlung von Glukose in Hyaluronat liegt bei dem verfahrensgemäßen Vorgehen bei 4% bis 10%.

Der gefundene Stamm wurde am 06. 12. 1995 unter der Hinterlegungsnummer 10348 in der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Braunschweig (DSMZ) hinterlegt.

Das erfindungsgemäß durchgeführte Fermentationsverfahren ist insofern ungewöhnlich, als in den bisher bekannten Herstellungsprozessen für Hyaluronat die möglichst effektive Umwandlung der Glukose in das Hyaluronat angestrebt wurde. Der Konversionsgrad Y<sub>HS/Gl</sub> des gefundenen Stammes liegt im unteren Bereich der in der Patentliteratur angegebenen Werte (Maximalwert 15%). Der große Vorteil der hier vorgeschlagenen Vorgehensweise, daß bei der Fermentation eine sehr große Raum-Zeit-Ausbeute sowie eine besonders hohe Molmasse erreicht wird, wiegt die Nachteile des ungünstigeren Konversionsgrades auf.

Die erfindungsgemäße Durchführung der Fermentation kann als fed-batch-Prozeß erfolgen; die Erfindung erstreckt sich jedoch auch auf die Durchführung von zyklischen fed-batch-Fermentationen und auf die Durchführung von kontinuierlichen Fermentationen (Chemostatenprinzip). Durch die semikontinuierliche bzw. kontinuierliche Durchführung werden unproduktive Rüstzeiten sowie die unproduktiven Phasen der Fermentation (Start- und Sättigungsphase) mit dem Ergebnis einer höheren Raum-Zeit-Ausbeute verkürzt.

Für die Gewährleistung der Reproduzierbarkeit der genannten Kenngrößen bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Fermentationsverfahrens, insbesondere der Hyaluronat-Endkonzentration bzw. der Produktivität ist es erforderlich, daß im Fermenter zu keiner Zeit Glukosemangel auftritt. Eine untere nicht zu unterschreitende Glukosekonzentration von 1 gl<sup>-1</sup> hat sich als zweckmäßig erwiesen.

Weiterhin ist für das Erreichen der genannten hohen Produktendkonzentration und der hohen physiologischen Raum-Zeit-Ausbeute die Homogenität der Kulturlösung bezüglich Azidität, Temperatur und Nährstoffkonzentration wesentlich. Das erfordert eine ausreichende Durchmischung auch bei der mit der Produktkonzentration steigenden Viskosität der Kulturlösung insbesondere zum Ende der Fermentation. Für das Erreichen der angegebenen hohen Molmassen dürfen dagegen keine zu großen Scherkräfte durch zu hohe Rührerdrehzahlen auftreten.

Es wurde gefunden, daß durch den Einsatz eines schiffsschraubenförmigen Rührers mit einer Drehzahl von 200 min<sup>-1</sup> bis 300 min<sup>-1</sup> bei einer Viskosität von bis zu 80 mPas (Schergeschwindigkeit ≤ 20 s<sup>-1</sup>) am Ende einer batch-Fermentation die Mischzeit (Kenngröße des Systems Fermenter — Rührer — Kulturmedium für die Geschwindigkeit der Durchmischung) unter einen Wert von 10 s herabgesetzt und die Endkonzentration von Hyaluronat um etwa 1 gl<sup>-1</sup> bis 2 gl<sup>-1</sup> bis auf einen Wert von 9 gl<sup>-1</sup> gesteigert wird. Dieser Befund deutet darauf hin, daß die physiologische Leistungsgrenze des Leistungstammes noch nicht erreicht ist, sondern die immer geringer werdende Durchmischung der Kultur infolge der hohen Viskosität zum begrenzenden Faktor der Biosynthese wird. Der Einsatz des schiffsschraubenförmigen Rührers führt bei den erfindungsgemäß selektierten Hyaluronatbildnern bei semikontinuierlicher und kontinuierlicher Fermentation ebenfalls zu einer Erhöhung der physiologischen Raum-Zeit-Ausbeute. Als weiterer Vorteil ergibt sich, daß bei schiffsschraubenförmigen Rührern wesentlich geringere Scherkräfte auftreten, wodurch die Gefahr verringert wird, daß Hyaluronatmoleküle mit hoher Molmasse in Stücken mit niedrigerer Molmasse zerschlagen werden.

Gefunden wurde auch, daß sich die Produktbildung bei fed-batch- und zyklischen fed-batch-Fermentationen für mehrere Stunden mit konstanter Rate fortsetzt, wenn die Azidität der Kulturlösung um 0,5 bis 0,7 pH-Einheit

ten auf Werte bis zu pH 7,6 erhöht wird, nachdem die Bildungsrate ihr Maximum durchlaufen hat. Diese Erhöhung kann in einem Schritt oder in mehreren Teilschritten erfolgen. Die Abnahme der Bildungsrate nach dem Durchlaufen ihres Maximums ist an der Abnahme des Anstiegs des Zähigkeitsverlaufes bzw. an der Abnahme der Laugendosierate erkennbar.

Bei der Durchführung einer fed-batch-Fermentation unter Einhaltung aller vorgenannten Bedingungen und unter Einsatz des schiffsschraubenförmigen Rührers wird die oben genannte Hyaluronatkonzentration von bis zu  $9 \text{ g l}^{-1}$  nach einer Fermentationszeit von 14 bis 20 Stunden erreicht.

Beim zyklischen fed-batch-Verfahren wird vor dem Beginn der Sättigungsphase der Produktbildung ein Teil der Kulturlösung geerntet und durch neues steriles Nährmedium ersetzt. Es wurde gefunden, daß sich bei der Ernte von 50% bis 95% (w/w) des Fermenterinhalt nach Erreichen einer Viskosität der Kulturlösung von 30 mPas bis 70 mPas, insbesondere jedoch von 45 mPas bis 60 mPas (Schergeschwindigkeit  $\leq 20 \text{ s}^{-1}$ ) eine hohe physiologische Raum-Zeit-Ausbeute über einen Gesamtprozeß mit 5 bis 9 Zyklen ergibt. Der Beginn der Ernte an jedem Zyklusende kann dabei über einen Zeitplan (Erfahrungswerte für Normalfermentationen) oder über on-line-Viskositätsmessung bestimmt werden. Die Viskositätsmessung ist jedoch zu bevorzugen, da sie gleichbleibende Hyaluronatkonzentration der geernteten Kulturlösung über den Gesamtprozeß gewährleistet.

Beim kontinuierlichen Fermentationsprozeß fließt nach einer Anwuchsphase Kulturlösung mit konstanter Rate ab und Nährlösung mit der gleichen Rate zu. Eine stabile Prozeßführung und hohe Produktivität wird bei einer Verdünnungsrate von  $0,2 \text{ h}^{-1}$  bis  $0,4 \text{ h}^{-1}$  erreicht; die Hyaluronatkonzentration der geernteten Kulturlösung beträgt dabei  $3 \text{ g l}^{-1}$  bis  $5 \text{ g l}^{-1}$ . Der Start des Austausches und die Regelung der Verdünnungsrate erfolgen über die on-line-Viskositätsmessung.

Zur thermischen Inaktivierung (Abtötung der Streptokokken) wird die Kulturlösung innerhalb von 10 bis 20 Minuten auf  $78^\circ\text{C}$  bis  $82^\circ\text{C}$  erhitzt und für 20 bis 25 Minuten auf dieser Temperatur gehalten. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Azidität der Kulturlösung zur Stabilisierung auf einen Wert zwischen pH 3,8 und pH 4,5 gestellt und anschließend der chemischen Aufarbeitung zugeführt.

## Ausführungsbeispiele

Ohne dadurch die Erfindung einzuschränken, soll sie in ihren Grundzügen durch Beispiele erläutert werden:

### Beispiel 1

#### Selektion

##### a. Stammvorselektion

Als Quelle für die Streptokokkenstämme der Lancefieldgruppe C dient eine Stammsammlung, in der die Stämme in Magermilch lyophilisiert vorliegen. Die Gruppenzugehörigkeit wird mit dem Slidex Strepto Kit (bio-Mérieux) getestet. Mit dem Material aus der Stammsammlung wird eine Submerskultur beimpft, deren Medium auf 1 Liter aufgefüllt 30 g Todd-Hewitt-Broth (Difco) enthält. Nach 8 Stunden Kultivierung bei  $37^\circ\text{C}$  werden 0,1 ml dieser Kultur auf der Oberfläche eines Blutagars ausgespatelt. Dieser enthält auf 1 Liter aufgefüllt 30,0 g Todd-Hewitt-Broth (Difco), 0,74 g Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat, 0,13 g Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat, 25 g Bacto Agar (Difco). Anhand des mukoiden Wachstums werden Hyaluronat bildende Stämme erkannt.

##### b. Überprüfung der Hyaluronsäurebildung in pH-geregelten Submerskulturen

Die vorausgewählten Stämme werden in einem gerührten und belüfteten Laborfermentor mit pH-Regelung unter Standardbedingungen auf ihre Fähigkeit, Hyaluronat zu bilden, untersucht.

Die Nährlösung der Impfkultur enthält im Liter 20,0 g Hefeextrakt (Serva oder Difco), 10 g pankreatisches Pepton, 1,75 g Natriumacetat, 7,00 g Natriumhydrogencarbonat, 7,00 g Dinatriumhydrogenphosphat, 5 g Natriumdihydrogenphosphat und 6 g Glukose.

Das im Fermenter eingesetzte Standardmedium enthält pro Liter 20,0 g Hefeextrakt, 12 g Pepton, 0,03 g Magnesiumsulfat Heptahydrat, 50,0 g Glukose und 0,5 g Kaliumhydrogenphosphat. Der Ansatz ohne die Glukose mit einem Volumen von 90% des Endvolumens wird bei  $121^\circ\text{C}$  45 Minuten autoklaviert. Die Glukose wird in wäßriger Lösung mit einem Volumen von 10% des Endvolumens autoklaviert. Nach Vereinigung der Lösungen wird die Azidität mit Natronlauge auf pH 7,0 eingestellt.

Nach einer Kultivierungszeit der Impfkultur von 12 Stunden wird der Laborfermenter mit 5% seines Arbeitsvolumens beimpft. Die Fermentationstemperatur beträgt  $34^\circ\text{C}$ . Zur Rührung wird ein 3-Ebenen-4-Blatt-Scheibenrührer eingesetzt. Die Azidität wird bei pH 6,9 bis pH 7,2 durch Titration mit 30%iger Natronlauge konstant gehalten. Gleichzeitig mit der Natronlauge-Dosage wird mit der gleichen Rate eine Glukoselösung zugeführt, die 750 g Glukose in 1000 ml Lösung enthält.

Die besten ausgewählten Stämme bilden innerhalb von 16 Stunden maximal  $7 \text{ g l}^{-1}$  bis  $8 \text{ g l}^{-1}$  Hyaluronat.

##### c. Überprüfung der Hyaluronidasebildung

Die leistungsbesten ausgewählten Stämme wurden in einem Fermenter auf einem pH-gepufferten Medium entsprechend 1.b. kultiviert. Das verwendete Medium enthielt bei sonst gleicher Zusammensetzung als C-Substrat statt Glukose Hyaluronat. Einer dieser Stämme zeigte unter diesen Bedingungen innerhalb von 10 Stunden

kein Wachstum, woraus geschlossen werden kann, daß keine extrazelluläre Hyaluronidasebildung vorhanden ist. Dieser Stamm (*Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* V 2541) wurde als Produktionsstamm ausgewählt.

## Beispiel 2

### Vorkulturen

#### a. Stammhaltung, erste und zweite Vorkultur

Der für die Stammhaltung verwendete Mischsäure-Blutagar enthält pro Liter folgende Substrate: 30 g Todd-Hewitt-Broth (Difco), 0,74 g Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat, 0,13 g Natriumhydrogenphosphat Dihydrat, 25 g Bacto Agar (Difco) und 50,0 g Milchsäure. Zur Herstellung dieses Spezialagars werden die Substrate mit Ausnahme des Bacto Agar in destilliertem Wasser gelöst, dessen Volumen etwa einem Drittel des vorgesehenen Endvolumens entspricht; die Azidität wird mit 30%iger Natronlauge auf pH 7,2 eingestellt, und mit destilliertem Wasser wird auf das halbe Endvolumen aufgefüllt. Danach wird die Lösung über eine G5-Fritte steril filtriert. Der Bacto Agar wird in destilliertem Wasser mit einem Volumen von 45% des Endvolumens gelöst und autoklaviert. Beide Ansätze werden im Wasserbad auf 50°C temperiert und dann unter Zugabe von 5% heparinisiertem Pferdeblut (800 E/100 ml) — bezogen auf das Endvolumen — gemischt. Die Mischung wird in Petrischalen zu einer Schichtdicke von etwa 3 mm gegossen.

Der Nährboden für die erste und zweite Vorkultur enthält pro Liter 20,0 g Hefeextrakt, 10,0 g pankreatisches Pepton, 1,75 g Natriumazetat, 7,0 g Natriumhydrogencarbonat, 3,5 g Natrium-Di-Hydrogenphosphat, 7,0 g Dinatriumhydrogenphosphat und 6,0 g Glukose. Die Glukose wird 20 Minuten bei 121°C autoklaviert und dem restlichen Nährboden zugesetzt, nachdem dieser 30 Minuten bei 121°C sterilisiert wurde und beide Anteile auf etwa 40°C abgekühlt sind.

Die erste Vorkultur mit einem Arbeitsvolumen von 50 ml wird von den Blutagar-Platten entsprechend dem Beispiel 1c beimpft.

In der zweiten Vorkultur mit einem Arbeitsvolumen von 500 ml, die mit 50 ml der ersten Vorkultur beimpft wird, wird das Impfmateriäl für die Hauptkultur im Fermenter erzeugt.

Die Kultivierung der Vorkulturen erfolgt als Standkulturen bei 34°C über 24 Stunden oder bei 37°C über 12 Stunden. Innerhalb dieses Zeitraumes wird die Glukose vollständig verbraucht und eine Biomasse von etwa 0,7 g l<sup>-1</sup> erreicht. Die erzeugte Kultur wird dann sofort zur Beimpfung eingesetzt, aber auch eine Lagerung des Impfmateriäls bei 6°C über mehrere Tage ist ohne Nachteile möglich. Die Beimpfungsvolumina liegen bei allen Beimpfungen zwischen 2% und 5% des Volumens der nachfolgenden Hauptkultur. Dem Fermentervolumen entsprechend wird die erforderliche Anzahl von Vorkulturen hergestellt.

#### b. Dritte Vorkultur

In einem weiteren Ausführungsbeispiel wird zur Beimpfung von Hauptkulturen mit einem Arbeitsvolumen ≤ 300 l eine Fermenterkultur als dritte Vorkultur eingesetzt, die mit der zweiten Vorkultur beimpft wird. Die Zusammensetzung des Nährbodens, die Sterilisation und die Fermentationsbedingungen für diese dritte Vorkultur entsprechen den für die Hauptkultur in Beispiel 3 angegebenen; es erfolgt jedoch keine Glukosezufütterung während der Fermentation. Die Biomassekonzentration des so erzeugten Impfmateriäls liegt bei 3 g l<sup>-1</sup> bis 4 g l<sup>-1</sup>.

## Beispiel 3

### fed-batch-Kultivierung

Das Hauptkulturmedium enthält pro Liter 20,0 g Hefeextrakt, 12,0 g pankreatisches Pepton, 0,5 g Kaliumhydrogenphosphat, 0,03 g Magnesiumsulfat Heptahydrat, 1,0 ml Entschäumer auf Silikonbasis, 32,5 µl eines Spurenelementkonzentrates (1 M Lösung von Co-, Fe-, Mn-, Zn-, Mg- und Cu-Salzen) und 50,0 g Glukose. Die Glukose wird separat 20 Minuten bei 121°C autoklaviert und dem restlichen Nährboden zugegeben, nachdem dieser 30 Minuten bei 121°C sterilisiert wurde und beide Anteile auf ca. 40°C abgekühlt sind.

Die Fermentation erfolgt in einem gerührten und belüfteten Edelstahlfermenter mit einem Arbeitsvolumen von 50 l bis 1000 l, der mit Meß- und Regeleinrichtungen für die Standardgrößen Temperatur und Azidität ausgerüstet ist. Während der 14 bis 20 Stunden dauernden Fermentation wird die Temperatur auf 34°C und die Azidität auf pH 7,0 geregelt. Die pH-Regelung erfolgt durch einen Schaltregler, der bei Unterschreitung des pH-Sollwertes sowohl eine Laugenpumpe als auch eine Glukosepumpe einschaltet und nach Wiedereinstellung des pH-Sollwertes ausschaltet. Zur pH-Regelung wird 45%ige Natronlauge und für die Glukosedosage eine Lösung von 750 g Glukose auf 1 l Lösung verwendet. Das Verhältnis der Fördervolumina Glukoselösung zu Natronlauge beträgt 1,5/1. Damit wird im Fermenter zu keinem Zeitpunkt eine Glukosekonzentration von 1,0 g l<sup>-1</sup> unterschritten. Durch die Rührung mit einer Drehzahl von 200 min<sup>-1</sup> bis 300 min<sup>-1</sup> und die Belüftung mit einer Rate von 3 bis 25 Liter pro Stunde und Liter Fermenterinhalt wird die Kultur durchmischt. Gegen Ende der Fermentation steigt die Viskosität der Fermentationslösung auf Werte von 80 mPas bis 90 mPas, gemessen mit einem Schwingungviskosimeter mit einer Schergeschwindigkeit von ≤ 20 s<sup>-1</sup>. Es wird eine Hyaluronatkonzentration von 7 g l<sup>-1</sup> bis 8 g l<sup>-1</sup> — beim Einsatz eines schiffsschraubenförmigen Rührers (Beispiel 6) bis 9 g l<sup>-1</sup> — erreicht; das entspricht einer physiologischen Produktivität von 0,35 g l<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> bis 0,5 g l<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. Die Molmasse des gebildeten Hyaluronats ist größer als 2,5 × 10<sup>6</sup> D; sie wurde mittels HPLC bestimmt.

## Zyklische fed-batch-Fermentation

Die Nährmediumzusammensetzung und die Bedingungen für die Sterilisation, Beimpfung und Fermentation für den zyklischen fed-batch-Prozeß entsprechen den für die fed-batch-Fermentation im Beispiel 3 beschriebenen. Das Medium für die Folgezyklen hat die gleiche Zusammensetzung wie das Medium für den Startzyklus und wird in sterilisierter Form bereitgestellt. Die sterilisierte Glukoselösung wird separat zugegeben.

Als Kriterium für das Ende eines Zyklus wird in einem Ausführungsbeispiel eine feste Zyklusdauer vorgegeben. Sie beträgt für den Startzyklus 10 bis 12 Stunden und für die Folgezyklen 7 bis 8 Stunden. In einer anderen Ausführung wird das Erreichen einer vorgegebenen Viskosität von 50 mPas bis 60 mPas im Fermenter verwendet; die Viskosität wird dazu on line kontinuierlich mit einem Schwingungviskosimeter mit einer Schergeschwindigkeit von  $\leq 20/s$  gemessen. Das Erreichen des Abbruchkriteriums wird durch eine Ablaufsteuerung erkannt, die dann die Ernte von 70% bis 75% der Kulturlösung und danach das Auffüllen des Fermenters mit dem frischen Nährmedium und der Glukoselösung auslöst und kontrolliert.

Bei typischen Fermentationen mit 7 Zyklen wird bei einer Hyaluronatkonzentration im geernteten Kulturmedium zwischen  $3,5 \text{ gl}^{-1}$  und  $4,5 \text{ gl}^{-1}$  eine physiologische Produktivität von  $0,55 \text{ gl}^{-1}\text{h}^{-1}$  bis  $0,60 \text{ gl}^{-1}\text{h}^{-1}$  über 50 Stunden erreicht.

## Beispiel 5

## Kontinuierliche Fermentation

In einer weitgehend analog Beispiel 4 durchgeführten kontinuierlichen Fermentation wird die Kulturlösung im Fermenter mit einer spezifischen Verdünnungsrate von  $D = 0,35 \text{ h}^{-1}$  kontinuierlich durch frisches Nährmedium ersetzt. Der Zufluß des Nährmediums wird 6 Stunden nach Beimpfen des Fermenters gestartet.

In einer anderen Ausführung wird der Zufluß des frischen Nährmediums bzw. der Abfluß der Kulturlösung gestartet, wenn die on line gemessene Viskosität der Kulturlösung einen Wert von 20 mPas erreicht hat. Die Verdünnungsrate wird dann so geregelt, daß dieser Viskositätswert konstant bleibt (Turbidostatprinzip).

Start und Regelung von Zu- und Abfluß erfolgen in beiden Fällen durch ein Prozeßleitsystem.

Bei einer 42-stündigen kontinuierlichen Fermentation wird eine durchschnittliche physiologische Raum-Zeit-Ausbeute von  $0,94 \text{ gl}^{-1}\text{h}^{-1}$  erreicht.

## Beispiel 6

## Verwendung eines speziellen Rührers

Bei Fermentationen nach Beispiel 3, 4 und 5 wird ein spezieller schiffsschraubenförmiger Rührer eingesetzt, der im unteren Drittel des Fermenters angeordnet ist und die Kulturlösung nach unten fördert. Mit diesem Rührer wird im Vergleich mit einem herkömmlichen 2-Ebenen-4-Blatt-Rührer bei einer Drehzahl von  $300 \text{ min}^{-1}$  und einer Viskosität des Kulturmediums von 80 mPas die Einschwingzeit nach einer sprungförmigen Änderung eines Fermentationsparameters, z. B. der Temperatur, in ein Band mit der Breite von  $\pm 5\%$  um den stationären Endwert auf die Hälfte verringert. Für den schiffsschraubenförmigen Rührer läßt sich die Mischzeit angeben; sie beträgt 10 s. Bei einer batch-Fermentation wird nach 16 Stunden eine Hyaluronatkonzentration von  $8,8 \text{ gl}^{-1}$  erreicht.

## Beispiel 7

## Erhöhung der Azidität nach Erreichen der maximalen Produktbildungsrate

Bei Fermentationen nach Beispiel 3 und 4 wird nach Erreichen der maximalen Produktbildungsrate — gemessen in einem Beispiel über die analog verlaufende Laugendosierate oder in einem anderen Beispiel über das Maximum des Anstiegs des Viskositätsverlaufes — der Sollwert der pH-Regelung um 0,5 bis 0,7 pH-Einheiten erhöht. Dadurch wird die Produktbildung über mehrere Stunden mit konstanter Rate fortgesetzt und eine Erhöhung der physiologischen Produktivität um  $0,05 \text{ gl}^{-1}\text{h}^{-1}$  erreicht. Die Berechnung des Anstiegs und die Änderung des Sollwertes erfolgen durch ein Prozeßleitsystem.

## Beispiel 8

## Thermische Inaktivierung und pH-Absenkung nach Fermentationsende

Zur Abtötung der Streptokokken wird die Kulturlösung nach Beendigung der fed-batch-Fermentation entsprechend Beispiel 3 im Fermenter bzw. nach der Ernte am Zyklusende bei einer zyklischen fed-batch-Fermentation nach Beispiel 4 im Erntegefäß innerhalb von 10 bis 20 Minuten auf  $78^\circ\text{C}$  bis  $82^\circ\text{C}$  erhitzt und für 20 bis 25 Minuten auf dieser Temperatur gehalten. Bei kontinuierlicher Fermentation nach Beispiel 5 erfolgt die thermische Inaktivierung nach dem gleichen Temperatur-Zeit-Regime, wenn das Erntegefäß durch die kontinuierlich entnommene Kulturlösung gefüllt ist. Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur wird die Kulturlösung mit verdünnter Schwefelsäure auf eine Azidität von pH 3,8 bis pH 4,5 eingestellt und anschließend dem



## Beispiel 9

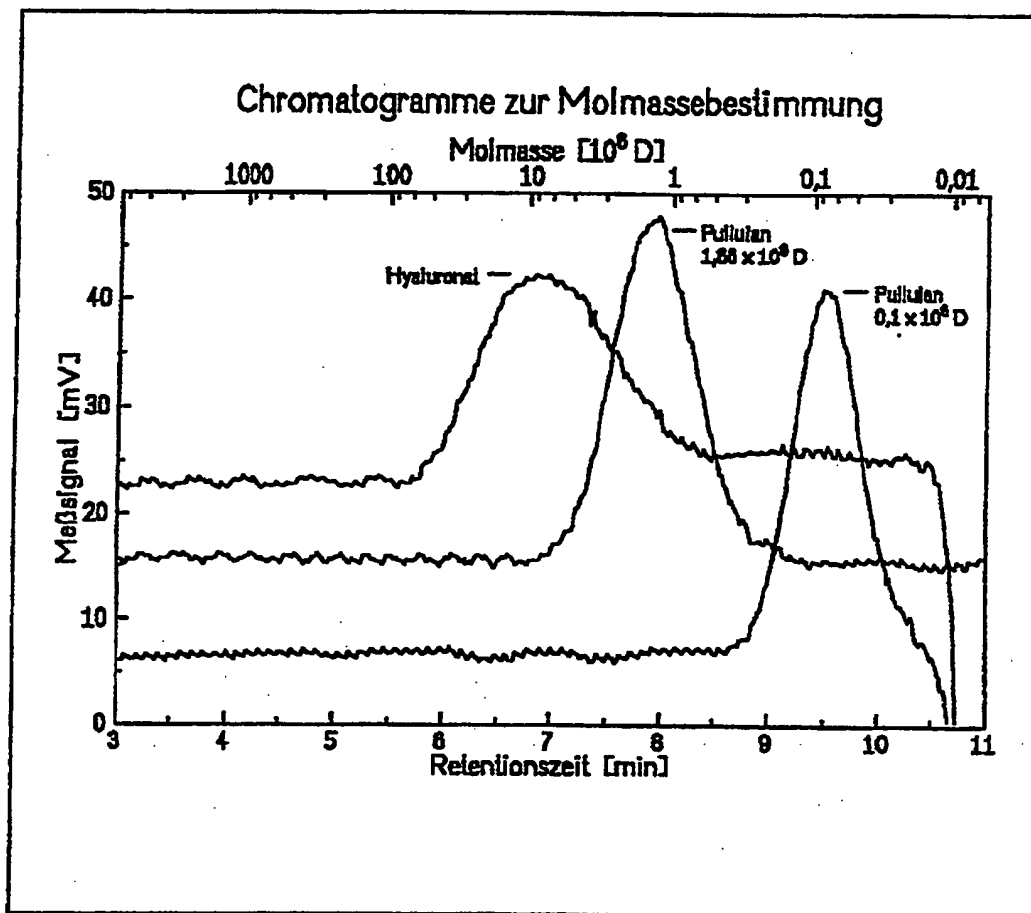
## Bestimmung der Molmasse

5

Die Bestimmung der Molmasse des Hyaluronats erfolgte mit Hilfe der HPLC-Methode (Gerät: Firma Kontron, RI-Detektor Abimed, Gilson; Säule: Pss Gel, HEMA BIO 2000,  $7,5 \times 300$  mm; Flow: 1 ml/min  $\text{NaNO}_3$  (isokratisch)). Die Säule wurde mit Pullulanen der Firma Polymer Standards Service, Mainz mit den Molmassen  $5,8 \times 10^3$  D,  $10,0 \times 10^3$  D,  $23,7 \times 10^3$  D,  $48,0 \times 10^3$  D,  $0,100 \times 10^6$  D,  $0,186 \times 10^6$  D,  $0,380 \times 10^6$  D und  $1,66 \times 10^6$  D geeicht, wobei 1 mg/ml der Standards in Wasser, bzw. in 100 mM  $\text{NaNO}_3$  gelöst und 20 ml auf die Säule injiziert wurden. Da keine Standards mit Molmassen über  $2 \times 10^6$  D verfügbar waren, mußte die Regressionsgerade für die genannten Standards über den Eichbereich hinaus extrapoliert werden.

Ein von der Firma Serva mit einer Molmasse von  $2,0 \times 10^6$  D angebotenes Hyaluronat wurde mit der hier genannten Methode gemessen; die ermittelte Molmasse stimmte mit dem von Serva angegebenen Wert überein.

Für das erfindungsgemäß hergestellte Hyaluronat wurde die in der folgenden Abbildung dargestellte Molmassenverteilung mit dem Maximum bei  $8 \times 10^6$  D gefunden:



## Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Hyaluronsäure bzw. ihre Salze enthaltenden Kulturlösungen unter Verwendung von Mikroorganismen der Gattung *Streptococcus*, gekennzeichnet dadurch, daß als Hyaluronatbildner der Stamm *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* V 2541 (DSM 10348) eingesetzt und in einer fed-batch, einer semikontinuierlichen oder einer kontinuierlichen Kultur unter Konstanzhaltung der Azidität bei pH 6,4 bis pH 7,6 und der Temperatur bei  $30^\circ\text{C}$  bis  $40^\circ\text{C}$  unter Aufrechterhaltung der Glukoseversorgung fermentiert wird und daß das in der Kulturlösung gelöste Hyaluronat Molmassen größer als  $2,5 \times 10^6$  D aufweist.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß während der Hyaluronatfermentation die Glukosekonzentration den Wert von  $1 \text{ g l}^{-1}$  nicht unterschreitet.
3. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß das Rührsystem des Fermenters bei einer Drehzahl von  $200 \text{ min}^{-1}$  bis  $300 \text{ min}^{-1}$  die Submerskultur während der Fermentation bei einer Viskosität von bis zu 80 mPas (Schergeschwindigkeit  $\leq 20 \text{ s}^{-1}$ ) mit einer Mischzeit kleiner als 10 s durchmischt.



4. Verfahren nach Punkt 1, 2 und 3, gekennzeichnet dadurch, daß die fed-batch-Fermentation nach 14 bis 20 Stunden beendet ist.
5. Verfahren nach Punkt 1, 2 und 3, gekennzeichnet dadurch, daß während der Fermentation nach Erreichen einer Viskosität der Kulturlösung von 30 mPas bis 70 mPas, bevorzugt jedoch 45 mPas bis 60 mPas (Schergeschwindigkeit  $\leq 20 \text{ s}^{-1}$ ), eine Menge von 50% bis 95% (w/w) der Kulturlösung entnommen und durch eine etwa gleiche Menge sterilen Nährmediums ersetzt wird und dieser Prozeß als zyklische fed-batch-Fermentation mehrfach wiederholt wird.
6. Verfahren nach Punkt 1, 2 und 3, gekennzeichnet dadurch, daß die Fermentation als kontinuierliche Kultur unter Zuführung frischen sterilen Mediums mit Verdünnungsraten zwischen  $0,2 \text{ h}^{-1}$  und  $0,4 \text{ h}^{-1}$  erfolgt und eine Hyaluronatkonzentration im steady state von  $3 \text{ g l}^{-1}$  bis  $5 \text{ g l}^{-1}$  erreicht wird.
7. Verfahren nach Punkt 1, 4 und 5, gekennzeichnet dadurch, daß der pH-Sollwert der Fermentation nach Erreichen der maximalen Produktbildungsrate sprunghaft in einem Schritt oder in mehreren Teilschritten um insgesamt 0,5 pH-Einheiten bis 0,7 pH-Einheiten erhöht wird, wobei der Höchstwert von pH 7,6 nicht überschritten wird.
8. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Kulturlösung nach Fermentationsende innerhalb von 10 bis 20 Minuten auf eine Temperatur von  $78^\circ\text{C}$  bis  $82^\circ\text{C}$  erwärmt wird, 20 Minuten bis 25 Minuten bei dieser Temperatur verbleibt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt wird.
9. Verfahren nach Punkt 1 und 8, gekennzeichnet dadurch, daß die Azidität der Kulturlösung nach dem Erhitzen und der Abkühlung auf Raumtemperatur auf einen Wert zwischen pH 3,8 und pH 4,5 gestellt wird.